



Doctoral Thesis

## **Mechanisms of protein resistance of adsorbed PEG-graft copolymers**

**Author(s):**

Pasche, Stéphanie

**Publication Date:**

2004

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004843028> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 15712

# **MECHANISMS OF PROTEIN RESISTANCE OF ADSORBED PEG-GRAFT COPOLYMERS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

Stéphanie Pasche  
Diploma in Chemical Engineering (EPF Lausanne) 2001  
born on December 19, 1978  
citizen of Oron-La-Ville (VD)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner  
Prof. Dr. Nicholas D. Spencer, co-examiner  
Prof. Dr. Hans J. Griesser, co-examiner

Zürich, September 2004

# ABSTRACT

---

A crucial aspect in the design of biomaterials and biosensor surfaces is to achieve control over the interfacial interactions between the synthetic material/device and the biological medium. Protein-resistant ("non-fouling") surfaces are particularly important in the context of blood-contacting biomedical devices, contact lenses, and as a non-interactive background for bio-diagnostic surfaces. Poly(ethylene glycol) (PEG) immobilized onto surfaces has been shown to confer high resistance to protein adsorption. The reasons for variable performance and optimal protein repellency of PEG layers have been the subject of much discussion; however there remains no general consensus on the molecular mechanisms underlying the protein resistance achieved with PEG coatings.

The aim of this thesis is to gain understanding into the mechanisms of protein resistance of PEG layers, using a comb-graft-copolymer, poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG), allowing systematic and controlled variations of the surface properties, such as PEG chain length and density, as well as

surface charge.

PLL-g-PEG is a polycationic copolymer, where PEG chains are grafted onto a PLL backbone. It is positively charged at neutral pH, and spontaneously adsorbs via electrostatic interactions onto negatively charged surfaces, such as many metal oxides (e.g. Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). A set of PLL-g-PEG polymers with different architectures was synthesized, varying in a systematic way the grafting ratio (ratio of the number of lysine monomers to the number of PEG side chains) between 2 and 26, with PEG molecular weights (1, 2 and 5 kDa). Poly(L-lysine) hydrobromide with molecular weights of ~20 and ~300 kDa was used as backbone for the co-polymer, corresponding to ~100 and ~1500 Lys-mer, respectively.

The polymers were adsorbed onto niobium oxide-coated substrates, leading to highly different, but well-controlled PEG surface densities with maximal values of 0.9, 0.5 and 0.3 chains/nm<sup>2</sup> for the three PEG molecular weights, respectively. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) was used in conjunction with the *in situ* optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) technique to investigate the interface architecture. While ToF-SIMS provided surface-analytical data on the polymeric adlayer, OWLS allowed for the quantitative determination of the adsorbed polymer mass. Extremely good correlations were established between the ToF-SIMS data (obtained in UHV) and the *in situ* OWLS results. The degree of interaction with proteins of such systems is believed to be related to the architecture of the polymer, in turn determined by PEG chain length and density. The amount of serum adsorbed, determined quantitatively by OWLS, was found to depend systematically on the surface coverage in terms of the ethylene glycol (EG) density, controlled by both PEG molecular weight and grafting ratio. Serum adsorption dropped gradually from 590 ng/cm<sup>2</sup> on bare Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> to <2 ng/cm<sup>2</sup> for EG densities ≥20 nm<sup>-2</sup> for the short PLL backbone. Conformation of the adsorbed copolymer

combined with stable anchoring on the surface were required for optimal protein resistance. The stability of the coatings against ionic strength was investigated as a function of the PLL backbone length, showing better stability for the long PLL backbone.

Detailed multivariate analysis using Principal Component Analysis (PCA) was applied to the positive and negative ion ToF-SIMS spectra, showing changes in the outermost surface of the polymer films, that were related to the density and molecular weight of the PEG chains on the surface. Partial Least Squares Regression (PLSR) was used to correlate the ToF-SIMS spectra with the serum adsorbed mass, resulting in a predictive model for determining the amount of protein adsorption based on the ToF-SIMS spectra.

The mechanical properties of PLL-g-PEG layers were studied by colloidal atomic force microscopy, in order to characterize the interfacial forces associated with the coatings of varying architectures, and to explore relationships between the interfacial forces and protein resistance. Varying the ionic strength between 1 and 160 mM allowed us to discriminate between steric and electrostatic forces, which were shown to vary substantially with the architecture of the PLL-g-PEG copolymers. For high PEG grafting densities the steric-entropic component was most prominent, whereas for lower grafting densities there was an electrostatic contribution from positively charged amine groups shining through the PEG coating at lower ionic strengths, in agreement with protein adsorption data. The interplay between steric and electrical double layer forces allowed one to estimate the thickness of the compressed PEG layer, associated to water molecules squeezed out of the layer, indicating  $\sim 80$  wt % water in the layer.

In order to elucidate the mechanisms of protein-PEG interactions the adsorption of model proteins onto various PEG-grafted surfaces was explored, investigating the influence of protein charge with lysozyme, alpha-lactalbumin and

myoglobin (model proteins), and surfaces with various charges and PEG surface densities. The charge of surfaces with graded PEG surface densities, from 0 to  $0.5 \text{ nm}^{-2}$ , was gradually changed from negative to positive, and characterized with colloidal AFM, providing information on the surface charge as a function of co-polymer architecture, and on the PEG layer thickness. The adsorption of the charged model proteins was shown to depend on a combination of surface charge, PEG thickness and grafting density, as well as on the ionic strength of the solution. PLL-g-PEG-coated surfaces enabled a quantitative control on the adsorption of model proteins.

PLL-g-PEG was shown to confer graded bio-interactiveness to surfaces it is adsorbed to. Relating the adlayer architecture and mechanical properties to the protein adsorption provided insight into the mechanisms underlying protein resistance by PLL-g-PEG adsorbed layers, as well as the basis for design criteria of PEG-based protein-resistant coatings.

# RÉSUMÉ

---

Le contrôle des interactions entre l'interface synthétique et les milieux biologiques constitue une exigence majeure dans la conception des biomatériaux et biosenseurs. Ceux-ci, avec le développement des matériaux en contact avec des tissus biologiquement actifs (prothèses, lentilles de contact, par exemple) d'une part, et des techniques de diagnostics biologiques exigeant un environnement neutre d'autre part, nécessitent des surfaces qui résistent à l'adsorption de protéines (dites "anti-adhésives"). Il a été démontré que la présence d'une couche de poly(éthylène glycol) (PEG) en surface confère à un matériau une haute résistance à l'adsorption de protéines. Les différences de performances anti-adhésives du PEG ont fait l'objet de multiples discussions; cependant, aucun consensus n'a été formulé à ce jour sur les mécanismes moléculaires responsables de la résistance aux protéines par les couches de PEG.

Cette thèse vise à une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la résistance à l'adsorption de protéines par des couches de PEG.

L'utilisation d'un co-polymère, le poly(L-lysine)-g-poly(éthylène glycol) (PLL-g-PEG), permet de varier de manière systématique et contrôlée certaines propriétés de la surface, telles la longueur et la densité des chaînes de PEG greffées, ainsi que la charge superficielle.

PLL-g-PEG est un copolymère composé de chaînes de PEG greffées sur une chaîne de poly(L-lysine) (support de chaîne), chargé positivement à pH neutre, et qui s'adsorbe de façon spontanée sur des surfaces négatives, tels certains oxydes métalliques (ex.  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ). La phase initiale de ce projet comprend la synthèse d'une série de polymères PLL-g-PEG de composition variable, avec un rapport de greffage entre 2 et 26 monomères de lysine par chaîne de PEG, des masses moléculaires de 1, 2 et 5 kDa pour les chaînes de PEG, ainsi que deux longueurs de chaînes de PLL, correspondant à  $\sim 100$  et  $\sim 1500$  monomères.

Les polymères sont alors adsorbés sur des substrats recouverts d'oxyde de niobium, conduisant à des densités variables de chaînes de PEG adsorbées, avec, pour maxima, respectivement 0.9, 0.5 et 0.3 chaînes par  $\text{nm}^2$  pour les trois longueurs de chaînes. L'architecture du polymère à l'interface est caractérisée par spectrométrie de masse (ToF-SIMS) combinée avec une technique optique basée sur un champ évanescent (OWLS). Alors que la technique ToF-SIMS fournit des informations physico-chimiques à l'interface, la technique OWLS permet de déterminer quantitativement la masse adsorbée de polymère. L'excellente corrélation entre les deux techniques révèle un contrôle de l'architecture du polymère à l'interface. Les différentes surfaces sont alors immergées dans une solution de sérum, dont la masse adsorbée est déterminée avec la technique OWLS. Celle-ci révèle une dépendance systématique de la composition du polymère à la surface, précisément du nombre de monomères d'éthylène glycol (EG) par  $\text{nm}^2$ . La masse de sérum adsorbée diminue graduellement de  $590 \text{ ng/cm}^2$  sur l'oxyde de niobium à  $<2 \text{ ng/cm}^2$  sur des sur-



faces recouvertes de  $>20$  EG - monomères par  $\text{nm}^2$ . La résistance à l'adsorption de protéines dépend également de la conformation du co-polymère à l'interface ainsi que de sa stabilité. La stabilité de certains co-polymères en fonction de la force ionique de la solution est accrue par l'utilisation de longues chaînes de PLL comme support de chaîne.

L'analyse détaillée des spectres ToF-SIMS utilisant la technique PCA (analyse en composantes principales) permet d'identifier des variations dans la couche superficielle des films de polymères, en relation avec la longueur et la densité des chaînes de PEG à l'interface. De plus, la méthode de régression PLS (moindres carrés partiels) permet de corrélérer les spectres ToF-SIMS avec la masse de sérum adsorbée, menant à un modèle prédictif pour la détermination de l'adsorption de protéines basée sur des spectres ToF-SIMS.

Les propriétés mécaniques du polymère adsorbé sont étudiées avec un microscope à force atomique (AFM) modifié pour des applications colloïdales. La compression du polymère entre le substrat et une microsphère en oxyde de silicium permet l'investigation des forces interfaciales en fonction de l'architecture du polymère, en relation avec leur résistance aux protéines. La mesure des interactions à différentes forces ioniques permet d'identifier et de séparer les deux composantes principales de la force totale, stérique et électrostatique. Alors qu'une répulsion stérique domine pour les fortes densités de PEG, les faibles densités de PEG laissent transparaître la charge positive de la PLL, ce qui se traduit par une attraction électrostatique. L'interaction entre les forces stérique et électrostatique permet en outre d'estimer l'épaisseur des chaînes compressées, directement associées aux molécules d'eau éjectées hors de la couche, indiquant  $\sim 80\%$  de masse d'eau présente dans les couches de PEG.

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des interactions entre protéines et chaînes de PEG, l'adsorption de trois protéines "modèles" sur des surfaces recouvertes de PLL-g-PEG montre l'influence de la charge des pro-

téines en fonction de la charge superficielle ainsi que de la densité des chaînes de PEG. La caractérisation des surfaces par AFM fournit des informations sur la charge de la surface, ainsi que sur l'épaisseur des chaînes de PEG. L'adsorption de lysozyme, myoglobine et alpha-lactalbumine sur les différentes surfaces révèle une dépendance combinée de la charge superficielle, de la densité des chaînes de PEG, ainsi que de l'épaisseur de la couche, en relation avec la force ionique de la solution. La modification de surfaces avec le co-polymère PLL-g-PEG permet de surcroît un contrôle quantitatif quant à l'adsorption des protéines modèles.

Cette étude démontre la capacité du co-polymère PLL-g-PEG à conférer à des surfaces un degré variable d'interaction avec un milieu biologique, par un simple procédé d'adsorption spontanée. L'étude de la composition, de l'architecture, des propriétés mécaniques et de la résistance aux protéines du polymère adsorbé permet de mieux comprendre les mécanismes responsables de la résistance aux protéines produite par une couche de PLL-g-PEG, et fournit les critères pour la réalisation de surfaces anti-adhésives basées sur le PEG.